

10/562059 PCT/JP 2004/009521

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

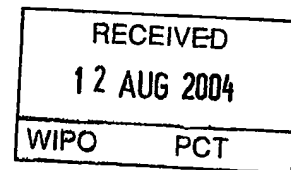
29. 6. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 6月30日

出願番号
Application Number: 特願2003-187931
[ST. 10/C]: [JP 2003-187931]



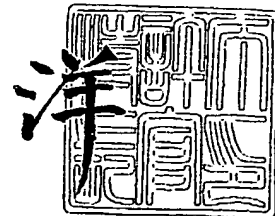
出願人
Applicant(s): 梶原 康宏
三洋化成工業株式会社
大塚化学株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月30日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3067489

【書類名】 特許願
【整理番号】 S20311
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C07C233/00

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区牛久保東2-4-2-205

【氏名】 梶原 康宏

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1 三洋化成工業株式会社内

【氏名】 前田 広景

【発明者】

【住所又は居所】 徳島県徳島市川内町加賀須野463 大塚化学株式会社
研究技術センター内

【氏名】 深江 一博

【特許出願人】

【識別番号】 502244258

【氏名又は名称】 梶原 康宏

【特許出願人】

【識別番号】 000002288

【氏名又は名称】 三洋化成工業株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 302060306

【氏名又は名称】 大塚化学株式会社

【代理人】

【識別番号】 100081536

【弁理士】

【氏名又は名称】 田村 巖

【電話番号】 06-6864-3137

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 020086

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド、これを含む医薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド。

【請求項 2】 脂肪酸が炭素数 8～24 の脂肪酸である請求項 1 に記載のジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド。

【請求項 3】 脂肪酸が炭素数 10～22 の脂肪酸である請求項 2 に記載のジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド。

【請求項 4】 脂肪酸がカプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキシン酸、ベヘン酸およびオレイン酸からなる群から選ばれる 1 種以上である請求項 3 に記載のジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド。

【請求項 5】 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドならびに製剤用添加物からなる組成物。

【請求項 6】 製剤用添加物が乳糖、グリセリン、ブドウ糖、ショ糖およびマンニトールからなる群から選ばれる 1 種以上の添加物である請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】 ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドを含む医薬。

【請求項 8】 ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド及びジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンから選ばれる 1 種以上ならびに製剤用添加物からなる医薬。

【請求項 9】 ウイルス疾患の予防剤及び／又は治療剤である請求項 7 または 8 に記載の医薬。

【請求項 10】 インフルエンザウイルス感染症の予防剤及び／又は治療剤である請求項 7～9 のいずれか 1 項に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド、これを含む組成物又は医薬に関する。

【0002】**【従来の技術】**

インフルエンザは毎年のように世界中で流行している感染症で、ワクチンが存在するにもかかわらず、多くの人が毎年感染し、発熱、頭痛、筋関節痛などに悩まされる。また合併症であるインフルエンザ脳炎・脳症にかかることにより最悪の場合死に至る。ワクチンが存在するにもかかわらずインフルエンザウイルスがここまで恐れられている原因は、インフルエンザウイルスが遺伝子突然変異を起こしやすく、抗原の形が変化しワクチンによって体内に増加した抗体がそれを認識しなくなりワクチンの効き目が低下してしまうことにある。このように毎年どのような型のインフルエンザが流行するかある程度予測がついたとしても、突然新型のウイルスが発生したりするので、適切なワクチンを迅速に供給できないことが問題となっている。そこで多種のインフルエンザウイルスに効き目があるような特效薬を開発する必要がある。近年、インフルエンザウイルスの感染機構、分子・遺伝子レベルでの解明が科学技術の飛躍的な進歩により実現でき、さまざまなインフルエンザウイルス感染阻害剤の合成が検討されている。

【0003】

インフルエンザウイルスの感染、増殖の機構は以下の通りである。まずウイルスが生体内に侵入し、宿主細胞に近づくとウイルス表層上のヘマグルチニンという3量体のタンパク質が宿主細胞上のレセプターであるシアリル糖鎖に特異的に結合する。シアリル糖鎖は末端にシアル酸を含み、主にこのシアル酸がヘマグルチニンとの結合に関与している。次に、ウイルスと宿主細胞の膜融合が起こり、ウイルスのRNAが宿主細胞内に流れ込み、次いでウイルス遺伝子がそこで複製され、子ウイルスが出現する。そして宿主細胞外にウイルスが出芽し増殖が完了する。ウイルスが出芽する際に、再度ヘマグルチニンとシアリル糖鎖が結合してしまうが、同じウイルス表層上にあるシアリダーゼという酵素がシアリル糖鎖からシアル酸を切り離し、出芽することができる。

【0004】

近年、このウイルス感染の最終段階で起こるシアリダーゼ反応の作用を阻害する新しい治療薬が作られた。それがザナミビル（商品名：リレンザ、グラクソ・ウエルカム社）とリン酸オセルタミビル（商品名：タミフル、日本ロシュ社）である。しかし、この2つのシアリダーゼ阻害剤は感染の最終段階を阻害するのでウイルスの増殖がピークに達してからでは効果が少なく、発症後48時間以内の投与が望ましい。このことから、効果的な治療薬として、ウイルスが宿主細胞に結合する最初の段階を阻害するような化合物を合成することが望まれている。

【0005】

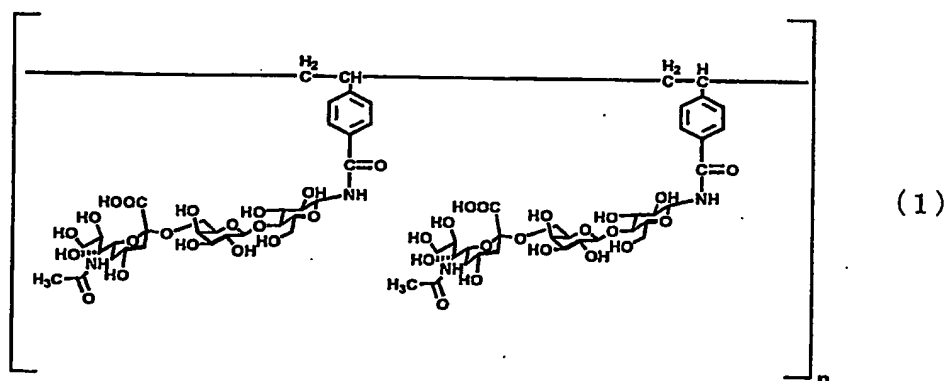
ヘマグルチニン阻害剤の開発において、すでに単価性のシアリル糖鎖誘導体よりもシアリル糖鎖を分子内に複数持つ多価性シアリル糖鎖誘導体のほうがインフルエンザウイルスに対して高い阻害作用を持つことが知られている。これは、ウイルス表面上に多数存在するヘマグルチニンに複数の単価性シアリル糖鎖誘導体が結合するよりも分子内に多数、シアリル糖鎖誘導体が結合した多価性分子が結合するほうが、リガンドとレセプターの親和力が増大するためである。

【0006】

現在までに、このような効果を期待して多価性シアリル糖鎖誘導体が多数合成されている。蟹江らはシアリルラクトースを結合したスチレンポリマー（1）を合成しインフルエンザとの結合を調べたところ、シアリル糖鎖タンパク質であるフェツインに比べて1000倍強い阻害活性があることを示した。

【0007】

【化1】

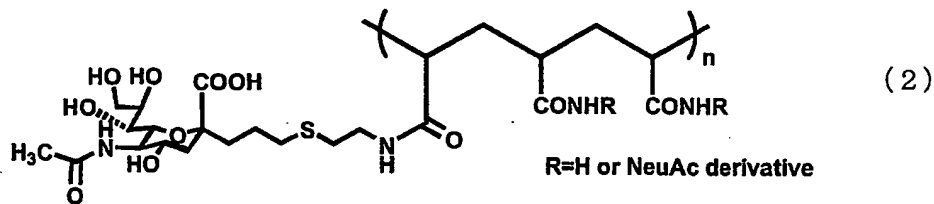


【0008】

また、Whitesides らはシアル酸誘導体を結合したポリアクリルアミドポリマー (2) を合成し高分子のポリマーであるほど阻害活性が高いことを示した。

【0009】

【化2】



【0010】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、高分子化合物であるポリマーは、さまざまな分子量を持つポリマーの混合物であるため構造がはっきりしない。また、もしその化合物内に60KDa以上の分子量を持つものが含まれていれば、それらは分子量が大きすぎて腎臓のマルピーギ小体でボーマン嚢にろ過されず体外に排出されないため体内に残存し、肝臓における代謝のバランスを崩し、人体に害を与える可能性を持っている。そのためFDA (The Food Drug Administration) は実際このようなポリマー型の化合物は有効なインフルエンザ感染阻害剤であっても安全性に問題があるとして承認していない。

【0011】

本発明の課題は新規なジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド、これを含む組成物又は医薬を提供することにある。

また本発明の課題は優れたウイルス感染及び／又は増殖阻害作用を有するインフルエンザウイルス感染症などのウイルス疾患の予防剤及び／又は治療剤を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明は、ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドに係る。

また本発明はジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドを含む組成物

又は医薬に係る。

また本発明はジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンを含む医薬に係る。

【0013】

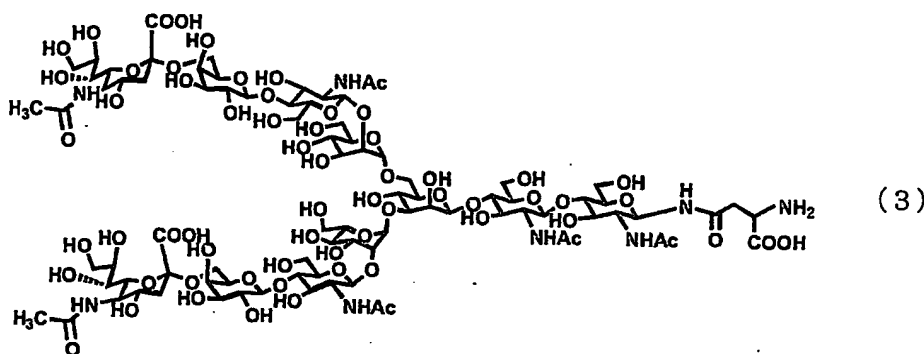
【発明の実施の形態】

本発明のジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドは、ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンと脂肪酸を反応させて得られる化合物である。

ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンは下記に示される糖鎖アスパラギン (3) である。

【0014】

【化3】



【0015】

このジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンは、例えば特願2002-196821の参考例1に従って合成することができる。

本発明において脂肪酸アミドを構成する脂肪酸としては、炭素数6～32の脂肪族飽和もしくは脂肪族不飽和脂肪酸ならびにこれらの2種以上の併用が挙げられる。脂肪族飽和脂肪酸としては、直鎖もしくは分岐のヘキサン酸（カプロン酸、2-エチルブタン酸等）、ヘプタン酸（エナント酸等）、オクタン酸（カプリル酸、2-エチルヘキサン酸等）、ノナン酸（ペラルゴン酸等）、デカン酸（カプリン酸等）、ウンデカン酸（ウンデシル酸等）、ドデカン酸（ラウリン酸、2-エチルデカン酸等）、トリデカン酸（トリデシル酸等）、テトラデカン酸（ミリスチン酸等）、ヘキサデカン酸（パルミチン酸等）、オクタデカン酸（ステアリン酸等）、エイコサン酸（アラキン酸等）、ドコサン酸（ベヘン酸等）、テト

ラコサン酸（リグノセリン酸等）などが挙げられる。

【0016】

脂肪族不飽和脂肪酸としては、直鎖もしくは分岐のオクテン酸、デセン酸、ウンデセン酸（ウンデシレン酸等）、ドデセン酸、オクタデセン酸（オレイン酸、エライジン酸等）、リノール酸およびリノレン酸等が挙げられる。これらの脂肪酸のうち好ましいのは炭素数8～24、さらに好ましくは酸素数10～22の脂肪酸であり、特に好ましくはデカン酸、ドデカン酸、テトラデカン酸、ヘキサデカン酸、オクタデカン酸、エイコサン酸、ドコサン酸およびオクタデセン酸であり、最も好ましくは直鎖のものであって、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキン酸、ベヘン酸およびオレイン酸である。

【0017】

ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンと脂肪酸の反応は好ましくは反応活性化剤の存在下に反応させるのが良い。反応活性化剤としては例えばN-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）等を挙げることができる。

ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンと脂肪酸の反応割合はジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン1モルに対して脂肪酸を約0.1～10モル使用するのが好ましい。反応活性化剤はジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン1モルに対して約0.1～10モル使用するのが好ましい。反応は通常0～80℃、好ましくは10～60℃で行うのが良く、通常約10分～5時間で終了する。

【0018】

得られたジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドは、例えば濾過、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等で精製することができる。これら化合物の同定はNMR、HPLC（ODSカラム）でUVにおける検出時間等により行うことができる。

【0019】

本発明のジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドはジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンの親水基と、長い炭素鎖を有する脂肪酸の疎水基の両方を併

せ有するため、水溶液中では図1に示すようなミセル化が容易に起こり、低分子型で分子量、構造が明確な多価性糖鎖アスパラギン誘導体を得ることができる。

このように単価性分子のミセル化を利用すれば分子量の差異もなく、化合物を低分子に抑えられ、ポリマーよりも比較的簡単に合成できる。そしてミセル化し多価性にすることにより、例えばインフルエンザウイルスに対して極めて優れた阻害活性を示すことができる。

【0020】

本発明の医薬は上記ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドを有効成分として含有するものである。また本発明の医薬はジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンを有効成分として含有するものである。

本発明の医薬は、上記有効成分と製剤用添加物（担体、賦形剤など）とを含む医薬組成物の形態で提供される。担体としては、例えば、乳糖、グリセリン等を例示することができる。賦形剤としては、例えば、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等を例示することができる。

【0021】

本発明の医薬の投与経路は特に限定されず、経口投与または非経口投与（例えば、筋肉内投与、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、鼻腔などへの粘膜投与、または吸入投与など）の何れでもよい。本発明の医薬の形態は特に限定されず、経口投与のための製剤としては例えば、錠剤、カプセル剤、細粒剤、粉末剤、顆粒剤、液剤、シロップ剤などが挙げられ、非経口投与のための製剤としては例えば、注射剤、点滴剤、座剤、吸入剤、経粘膜吸収剤、経皮吸収剤、点鼻剤、点耳剤などが挙げられる。

【0022】

本発明の医薬の形態、使用すべき製剤用添加物、製剤の製造方法などは、いずれも当業者が適宜選択可能である。本発明の医薬の投与量は、患者の性別、年齢または体重、症状の重症度、予防または治療といった投与目的、あるいは他の合併症状の有無などを総合的に考慮して適宜選択することができる。投与量は、一般的には、 $0.001 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日～ $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日、好ましくは $0.001 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日～ $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日である。

【0023】

【実施例】

以下に参考例、実施例、試験例を挙げ、本発明を具体的に説明するが、何らこれに限定されるものではない。

$^1\text{H-NMR}$ はBruckerのAVANCE 400 (400MHzと表記)で測定した。重溶媒を用いたときは溶媒ピークを基準とした。化学シフトは、 δ (ppm)で結合定数はJ (Hz)で示した。反応検出用 (以下TLC) としてはE. Merck社製DC-Platten Kieselgel 60 F254 (Art 1, 05715)を使用した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のカラムはナカライテスク社のCOSMOSIL PACKED ODS COLUMN ($\phi 4.6 \times 150\text{mm}$)、昭和電工社製のShodex C18-5Bを使用した。分光蛍光光度計はJASCO社製のFP-210 Spectrofluorometerを用いた。

【0024】

参考例1 ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-1の合成

粗精製のSGP (シアリルグリコペプチド) (238.3mg, $80.6\mu\text{mol}$)とアジ化ナトリウム (4.77mg, $80.8\mu\text{mol}$)をトリス-塩酸・塩化カルシウム緩衝溶液 (TRIZUMA BASE 0.05mol/l , 塩化カルシウム 0.01mol/l , pH=7.5) 7.15mlに溶解させた。そこにアクチナーゼ-E (53.8mg)を加え、 37°C で反応させた。165時間後、TLCで反応終了確認後、濾過し、濾液を凍結乾燥した。凍結乾燥後、残留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (sephadex G-25 $\phi 2.5\text{cm} \times 100\text{cm}$)で精製し、目的物のアスパラギンジシアロウンデカ糖1 (収量100.5mg, 収率53%)を得た。

【0025】

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, D_2O)

δ 5.22 (1H, s, Man4-H1), 5.16 (1H, d, $J=9.6\text{Hz}$, GlcNAc-H1), 5.04 (1H, s, Man4'-H1), 4.86 (1H, s, Man3-H1), 4.70-4.68 (3H, m, GlcNAc2

-H₁ GlcNAc 5,5' -H₁), 4.53 (2H, d, J=6.7 Hz, Gal 6,6' -H₁), 4.34 (1H, bd, Man 3-H₂), 4.28 (1H, bd, Man 4' -H₂), 4.20 (1H, bd, Man 4-H₂), 3.03 (2H, dd, J=4.2 Hz, 17.2 Hz, Asn-βCH), 2.95 (2H, dd, J=6.9 Hz, 17.1 Hz, Asn-βCH), 2.76 (2H, dd, J=4.6 Hz, 12.4 Hz, NeuAc 7,7' -H_{3eq}), 2.14 (18H, s×6, -Ac), 1.80 (2H, dd, J=12.2 Hz, 12.1 Hz, NeuAc 7,7' -H_{3ax})

【0026】

実施例1 ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-デカン酸アミド3の合成

デカン酸 (22 mg, 127.6 μmol) をジメチルホルムアミド 1 ml に溶かし、そこにジシクロヘキシルカルボジイミド (23.9 mg, 115.8 μmol) と N-ヒドロキシスクシンイミド (13.4 mg, 116.4 μmol) を加え、室温で反応させた。6 時間後、濾過し、濾液を濃縮し残留物 (デカン酸スクシイミド体) を取り出した。次にアスパラギンジシアロウンデカ糖 1 (10.0 mg, 4.27 μmol) を水 0.8 ml に溶かし、そこに炭酸水素ナトリウム (1.4 mg, 16.7 μmol) を加えた。そこにアセトン 1.2 ml に溶かしたデカン酸スクシイミド体 (3.2 mg, 11.8 μmol) を加え室温で攪拌した。180 分後 TLC で原料消失を確認し溶液を凍結乾燥した。凍結乾燥後、残留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (sephadex G-25 φ 1.0 cm×20 cm) で精製し、凍結乾燥した。凍結乾燥後、高速液体クロマトグラフィー (ODS カラム φ 4.6×150 mm 展開溶媒はグラジエント 60 分で水 100%→アセトニトリル 100% 流速 1.0 ml/min) で精製し、目的物のデカン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 3 (収量 7.7 mg, 収率 72%) を得た。

【0027】

¹H-NMR (400 MHz, D₂O)

δ 5.23 (1H, s, Man 4-H₁), 5.12 (1H, d, J=9.6 Hz, GlcNAc-H₁), 5.04 (1H, s, Man 4' -H₁), 4.87

(1H, s, Man3-H₁), 4.71-4.69 (3H, m, GlcNAc2-H₁ GlcNAc5,5'-H₁), 4.59 (1H, dd, J=4.5 Hz, 8.0 Hz, Asn-αCH), 4.53 (2H, d, J=7.9 Hz, Gal6,6'-H₁), 4.34 (1H, bd, Man3-H₂), 4.29 (1H, bd, Man4'-H₂), 4.21 (1H, bd, Man4-H₂), 2.88 (2H, dd, J=4.4 Hz, 15.5 Hz, Asn-βCH), 2.78-2.70 (3H, m, NeuAc7,7'-H_{3eq}, Asn-βCH), 2.34 (2H, t, J=7.4 Hz, COCH₂), 2.14 (18H, s×6, -Ac), 1.80 (2H, dd, J=12.2 Hz, 12.0 Hz, NeuAc7,7'-H_{3ax}), 1.71-1.60 (2H, m, CH₂), 1.42-1.30 (12H, m, CH₂), 0.95 (3H, t, J=6.5 Hz, CH₃)

【0028】

実施例2 ジシアロウンデカアスパラギン-ミリスチン酸アミド4の合成

ミリスチン酸 (22.0 mg, 96.3 μmol) をジメチルホルムアミド 1 ml に溶かし、そこにジシクロヘキシルカルボジイミド (18.2 mg, 88.2 μmol) と N-ヒドロキシベンゾトリアゾール (11.9 mg, 96.7 μmol) を加え、室温で反応させた。6 時間後、濾過し、濾液を濃縮し残留物 (ミリスチン酸ベンゾトリアゾール体) を取り出した。次にアスパラギンジシアロウンデカ糖 1 (6 mg, 2.57 μmol) を水 0.8 ml に溶かし、そこに炭酸水素ナトリウム (0.86 mg, 10.3 μmol) を加えた。そこにアセトン 1.2 ml に溶かしたミリスチン酸ベンゾトリアゾール体 (2.8 mg, 7.70 μmol) を加え室温で攪拌した。180 分後 TLC で原料消失を確認し溶液を凍結乾燥した。凍結乾燥後、残留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (sephadex G-25 φ1.0 cm×20 cm) で精製し、凍結乾燥した。凍結乾燥後、高速液体クロマトグラフィー (ODS カラム φ4.6×150 mm 展開溶媒はグラジエント 60 分で水 100%→アセトニトリル 100% 流速 1.0 ml/min) で精製し、目的物のミリスチン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 4 (収量 5.3 mg, 収率 81%) を得た。

【0029】

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, D_2O)

δ 5.23 (1H, s, Man4- H_1), 5.12 (1H, d, $J=9.6\text{Hz}$, GlcNAc- H_1), 5.04 (1H, s, Man4'- H_1), 4.87 (1H, s, Man3- H_1), 4.70-4.69 (3H, m, GlcNAc2- H_1 GlcNAc5,5'- H_1), 4.59 (1H, dd, $J=4.6\text{Hz}$, 8.1Hz, Asn- αCH), 4.54 (2H, d, $J=7.8\text{Hz}$, Gal6,6'- H_1), 4.34 (1H, bd, Man3- H_2), 4.29 (1H, bd, Man4'- H_2), 4.20 (1H, bd, Man4- H_2), 2.88 (2H, dd, $J=4.6\text{Hz}$, 15.6Hz, Asn- βCH), 2.83-2.70 (3H, m, NeuAc7,7'- $\text{H}_{3\text{eq}}$, Asn- βCH), 2.34 (2H, t, $J=7.4\text{Hz}$, COCH_2), 2.14 (18H, s \times 6, -Ac), 1.80 (2H, dd, $J=12.1\text{Hz}$, 12.1Hz, NeuAc7,7'- $\text{H}_{3\text{ax}}$), 1.71-1.60 (2H, m, CH_2), 1.42-1.30 (20H, m, CH_2), 0.95 (3H, t, $J=6.5\text{Hz}$, CH_3)

【0030】

実施例3 ジシアロウンデカアスパラギンーステアリン酸アミド5の合成

ステアリン酸 (22.0mg, 77.3 μmol) をジメチルホルムアミド1ml に溶かし、そこにジシクロヘキシルカルボジイミド (14.4mg, 69.8 μmol) とN-ヒドロキシベンゾトリアゾール (9.5mg, 77.2 μmol) を加え、室温で反応させた。6時間後、濾過し、濾液を濃縮し残留物 (ステアリン酸ベンゾトリアゾール体) を取り出した。次にアスパラギンジシアロウンデカ糖1 (8.0mg, 3.36 μmol) を水1.2ml に溶かし、そこに炭酸水素ナトリウム (3.2mg, 38.1 μmol) を加えた。そこにアセトン1.8ml に溶かしたステアリン酸ベンゾトリアゾール体 (8.8mg, 20.2 μmol) を加え37℃で攪拌した。195分後TLCで反応終了を確認し溶液を凍結乾燥した。凍結乾燥後、残留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (sephadex G-25 ϕ 1.0cm \times 20cm) で精製し、凍結乾燥した。凍結乾燥後、高速液体クロマトグラフィー (ODSカラム ϕ 4.6 \times 150mm 展開溶媒はグラジエント60分で水100% \rightarrow アセトニトリル100%流速1.0ml/min) で精製した。

1/min)で精製し、目的物のステアリン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖5 (収量6.2mg, 収率69%)を得た。

【0031】

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, D_2O)

δ 5.23 (1H, s, Man4- H_1), 5.12 (1H, d, $J=9.5\text{Hz}$, GlcNAc- H_1), 5.04 (1H, s, Man4'- H_1), 4.86 (1H, s, Man3- H_1), 4.71-4.69 (3H, m, GlcNAc2- H_1 , GlcNAc5,5'- H_1), 4.59 (1H, dd, $J=4.6\text{Hz}$, 8.2Hz, Asn- αCH), 4.54 (2H, d, $J=7.8\text{Hz}$, Gal6,6'- H_1), 4.34 (1H, bd, Man3- H_2), 4.29 (1H, bd, Man4'- H_2), 4.20 (1H, bd, Man4- H_2), 2.88 (2H, dd, $J=4.7\text{Hz}$, 15.5Hz, Asn- βCH), 2.78-2.70 (3H, m, NeuAc7,7'- $\text{H}_{3\text{eq}}$, Asn- βCH), 2.34 (2H, t, $J=7.3\text{Hz}$, COCH_2), 2.16 (18H, s \times 6, -Ac), 1.80 (2H, dd, $J=12.1\text{Hz}$, 12.1Hz, NeuAc7,7'- $\text{H}_{3\text{ax}}$), 1.71-1.60 (2H, m, CH_2), 1.42-1.30 (28H, m, CH_2), 0.96 (3H, t, $J=6.7\text{Hz}$, CH_3)

【0032】

実施例4 ジシアロウンデカアスパラギン-ベヘン酸アミド6の合成

ベヘン酸 (20.0mg, $58.7\mu\text{mol}$) をジメチルホルムアミド3mlに溶かし、そこにジシクロヘキシルカルボジイミド (10.3mg, $50.0\mu\text{mol}$) とN-ヒドロキシベンゾトリアゾール (6.8mg, $50.3\mu\text{mol}$) を加え、室温で反応させた。19時間後、濾過し、濾液を濃縮し残留物 (ベヘン酸ベンゾトリアゾール体) を取り出した。次にアスパラギンジシアロウンデカ糖1 (5mg, $2.1\mu\text{mol}$) を水1.2mlに溶かし、そこに炭酸水素ナトリウム (2.0mg, $21.0\mu\text{mol}$) を加えた。そこにアセトン1.8mlに溶かしたベヘン酸ベンゾトリアゾール体 (8.8mg, $18.9\mu\text{mol}$) を加え37℃で攪拌した。20時間後TLCで反応終了を確認し溶液を凍結乾燥した。凍結乾燥後、残留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (sephadex G-25

φ1.0 cm×20 cm) で精製し、凍結乾燥した。凍結乾燥後、高速液体クロマトグラフィー (ODSカラムφ4.6×150 mm展開溶媒はグラジエント60分で水100%→アセトニトリル100% 流速1.0 ml/min) で精製し、目的物のベヘン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖6 (収量3.24 mg, 収率57%) を得た。

【0033】

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O)

δ 5.23 (1H, s, Man4-H₁), 5.12 (1H, d, J=9.2 Hz, GlcNAc-H₁), 5.04 (1H, s, Man4'-H₁), 4.86 (1H, s, Man3-H₁), 4.70-4.69 (3H, m, GlcNAc2-H₁ GlcNAc5,5'-H₁), 4.59 (1H, dd, J=4.5 Hz, 8.0 Hz, Asn- α CH), 4.54 (2H, d, J=7.4 Hz, Gal6,6'-H₁), 4.34 (1H, bd, Man3-H₂), 4.29 (1H, bd, Man4'-H₂), 4.21 (1H, bd, Man4-H₂), 2.88 (2H, dd, J=4.4 Hz, 16.4 Hz, Asn- β CH), 2.78-2.70 (3H, m, NeuAc7,7'-H_{3eq}, Asn- β CH), 2.35 (2H, t, J=7.3 Hz, COCH₂), 2.13 (18H, s×6, -Ac), 1.80 (2H, dd, J=12.1 Hz, 12.0 Hz, NeuAc7,7'-H_{3ax}), 1.71-1.60 (2H, m, CH₂), 1.42-1.30 (36H, m, CH₂), 0.95 (3H, t, J=6.6 Hz, CH₃)

【0034】

上記実施例1~4の各ジシアロウンデカアスパラギン-脂肪酸アミドの化学式を図2に示す。

【0035】

試験例1

インフルエンザウイルス感染阻害剤のシアリダーゼ阻害活性の測定

(1) 蛍光標識したN-アセチラクトサミン誘導体のシアリル化

ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドが水溶液中で実際にミセル化するかどうかを調べた。そこで蛍光標識したシアリル糖鎖に対するシアリダー

ゼ阻害活性を測定し、IC₅₀を求めた。もし、蛍光標識したシアリル糖鎖7に対してジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン1及び、合成した4つの糖脂質誘導体をそれぞれ共存させシアリダーゼ阻害活性を測定し、炭素鎖の長さに依存して阻害活性が増加すればそれはミセル化の効果と考えられる。まず蛍光標識したシアリル糖鎖を合成した。蛍光標識にはDansyl基を使用した。N-アセチルラクトサミン誘導体をDansyl標識した6-[(N-Dansyl) amino]-hexyl-O-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (以後Dansyl-LacNAcと表記する) を合成し、それにα(2,6)シアリルトランスフェラーゼを用いてガラクトースにシアル酸を転移させDansyl標識したシアリル糖鎖 (以後NeuAc-LacNAc-Dansylと表記する) を合成した。

【0036】

Dansyl-LacNAc、CMP-シアル酸、α(2,6)シアリルトランスフェラーゼ、アルカリンホスファターゼ、牛血清アルブミンをカコジル酸緩衝溶液(pH6.0, 50mM)に溶かし37℃で65時間反応させ、高速液体クロマトグラフィーで精製し、NeuAc-LacNAc-Dansyl7を69%の収率で得ることができた。化合物7の¹HNMRを測定したところ、シアル酸に特有のピークである3位のエキソトリアル、アキシシャルのプロトンピークが2.74ppm、1.80ppmに確認できた。また、原料のDansyl-LacNAcの¹HNMRと比較したところ7のガラクトースの1位のプロトンピークが原料のピークに比べて高磁場にシフトしていたのでガラクトース6位にシアル酸が結合していることがわかった。このようにして化合物7を同定した。上記反応を図3に示す。

【0037】

(2) ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドのシアリダーゼ阻害活性測定

NeuAc-LacNAc-Dansylをシアリダーゼにより加水分解させる実験に、合成した糖脂質誘導体3, 4, 5, 6及びシアリルラクトース、ジシ

アロウンデカ糖鎖アスパラギン1を阻害剤として加えそれぞれに対してIC50を求めた。反応条件は以下の通りである。100 μ MのNeuAc-LacNAc-Dansylにそれぞれの阻害剤を10 μ M、100 μ M、300 μ Mの3つの条件で加え（溶媒は牛血清アルブミンを溶かしたHEPES緩衝溶液）、そこにシアリダーゼを加えて37℃で30分間インキュベートした。そして蛍光標識したNeuAc-LacNAc-Dansylの分解率を高速液体クロマトグラフィーにより定量し、その結果からIC50を算出した。そしてその結果を基質別にグラフにまとめた。これらのグラフの縦軸は酵素反応を50%阻害するために必要な阻害剤の濃度（IC50）である。図4のグラフは系内のシアル酸量に対してIC50を求めたものである。アスパラギンジシアロウンデカ糖は分子内に2つシアル酸を含んでいるのでシアル酸の量に対してIC50を求める実測値を2倍した。図4のようになる。

【0038】

インヒビター自体のモル濃度に対して実測したIC50を求めるとシアリルラクトース以外のインヒビターのIC50は、図4の値の半分になる（図5）。図4のグラフから、一番炭素鎖の短いデカン酸が疎水基としてアスパラギンジシアロウンデカ糖1に結合するだけでIC50の値が、疎水基の結合していないジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン1の値の4分の3になることがわかった。これは親水基であるジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンに疎水基のカルボン酸が結合することによりその化合物がミセル化し、1つの分子内に多くのジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンを含むために、シアリダーゼに囚われる頻度が上昇し、NeuAc-LacNAc-Dansylのシアル酸除去が阻害される力が高まるためと考えられる。また疎水基の炭素鎖が長くなるほど（デカン酸→ミリスチン酸→ステアリン酸→ベヘン酸）IC50の値が系統的に小さくなることが判明した。これは疎水基の炭素鎖が長くなるほどミセル体の表面積が上昇し、その分子表面内に含まれるジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンの数が上昇するためにNeuAc-LacNAc-Dansylのシアル酸の加水分解を阻害する能力が高まったものと考えられる。また、図5から、分子内のシアリルラクト系が1つ増えるだけで、シアリダーゼに対する阻害活性が高まり、さらに炭素鎖の長いほどその

効果がより強くなることがわかった。

【0039】

(3) ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドのインフルエンザウイルス阻害活性測定

実施例 1～4 のジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド (図 2 の誘導体 3, 4, 5, 6) を阻害剤として加えそれぞれに対してをインフルエンザウイルス (ヘマグルチニン) 阻害活性求めた。反応条件は以下の通りである。

使用したインフルエンザウイルスは、A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) を使用した。

鶏受精卵に接種し、しょう尿膜液を採取し超遠心精製、ホルマリン不活化したものを精製ウイルス抗原として使用した。これをエーテル処理して HA (ヘマグルチニン) 分画を集めたものを HA split 分画とした。

- 1) 上記図 2 の誘導体 3, 4, 5, 6 の各 2 mg を PBS 1 ml に溶解した。
- 2) サンプルを原液、2 倍、4 倍、8 倍に PBS で希釈した。
- 3) 96 穴 U プレート (三光純薬) にサンプル各 10 μ l とウイルス希釈液 40 μ l を混和した。
- 4) 4℃ 60 分 静置した。
- 5) mixture に 50 μ l PBS を加えて 50 μ l の 2 倍階段希釈を作る。
- 6) ニワトリ赤血球 (日本バイオテスト研究所) を 0.5% になるように調整する。
- 7) 各 well に血球浮遊液 50 μ l を加えて混和し 4℃、60 分静置した。
- 8) インフルエンザウイルス (ヘマグルチニン) 阻害活性を測定した結果、誘導体 3: 190.0 μ mol、誘導体 4: 95.0 μ mol、誘導体 5: 47.5 μ mol、誘導体 6: 37.5 μ mol で阻害活性を示した。

【0040】

【発明の効果】

本発明のジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド並びにジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンは、特に優れたウイルス感染及び／又は増殖阻害作用を

有し、例えばインフルエンザウイルス感染症などのウイルス疾患の予防剤及び／又は治療剤として優れた効果を奏する。

【0041】

【図面の簡単な説明】

【図1】 ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドのミセルを示す図である。

【図2】 実施例1～4の各ジシアロウンデカアスパラギン-脂肪酸アミドの化学式を示す図である。

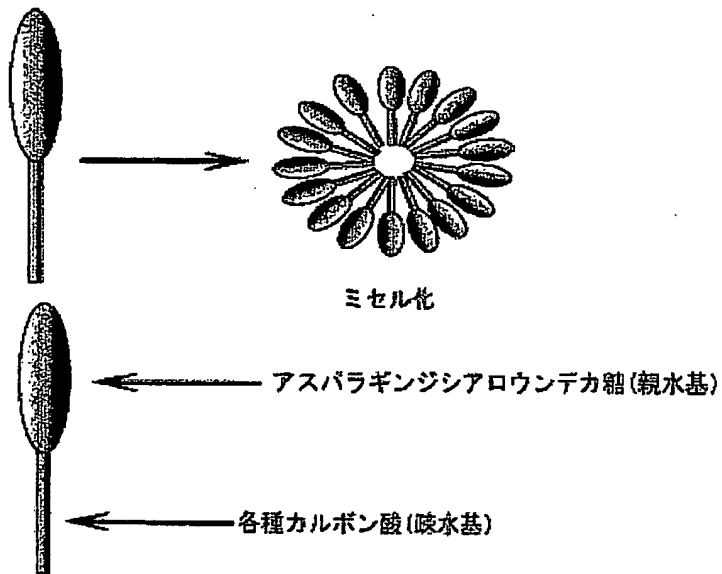
【図3】 Dansyl-LacNAcのシアリル化の反応スキームを示す図である。

【図4】 各阻害剤のシアリ酸量を基準にしたシアリダーゼ阻害活性を示す図である。

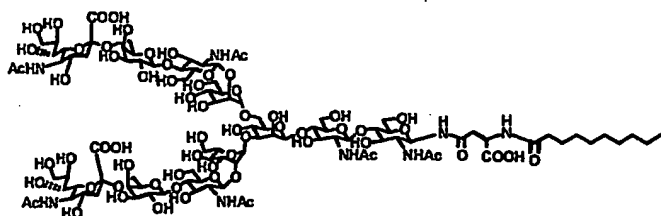
【図5】 各阻害剤のモル濃度を基準にしたシアリダーゼ阻害活性を示す図である。

【書類名】 図面

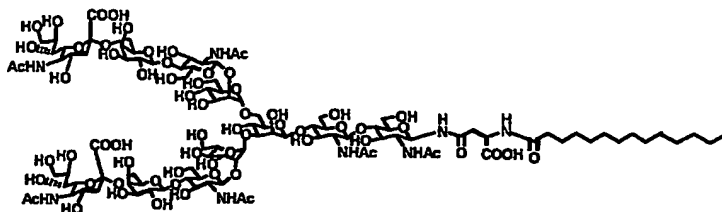
【図1】



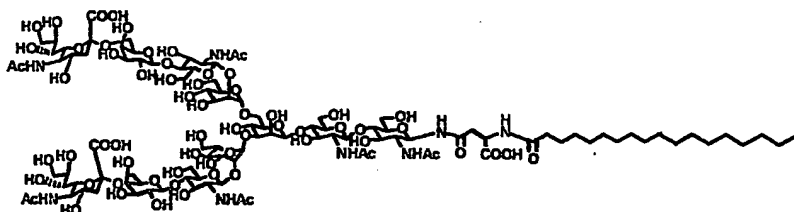
【図2】



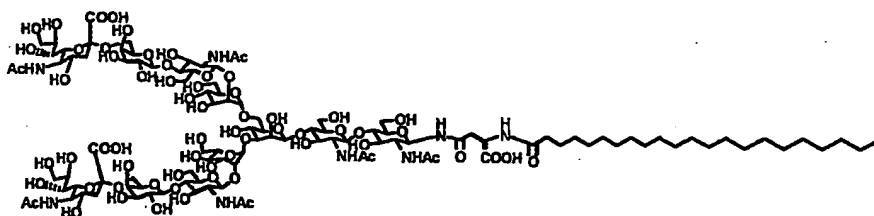
デカン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 3



ミリスチン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 4

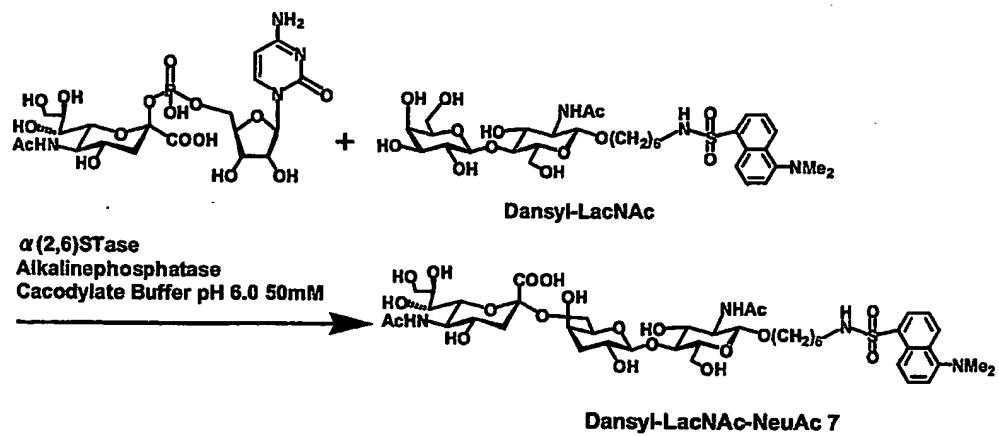


ステアリン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 5



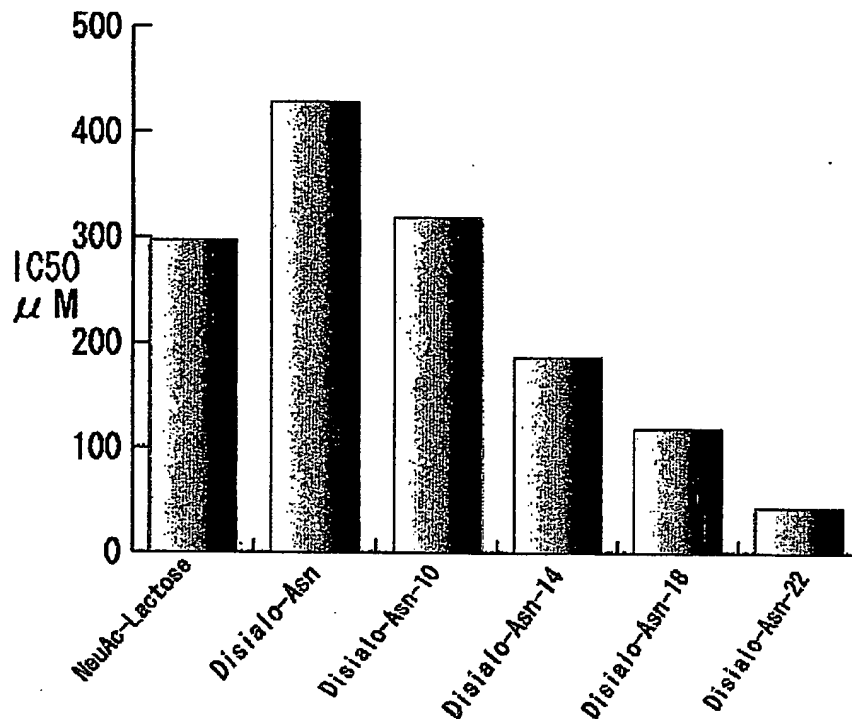
ベヘン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 6

【図 3】



【図 4】

Dansyl-LacNAc-NeuAc に対する各阻害剤のシアリダーゼ阻害活性
(各阻害剤のシアル酸量を基準にした IC₅₀)



略称

NeuAc-Lactose : シアリルラクトース

Disialo-Asn : アスパラギンジシアロウンデカ糖 1

Disialo-Asn-10 : デカン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 3

Disialo-Asn-14 : ミリスチン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 4

Disialo-Asn-18 : ステアリン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 5

Disialo-Asn-22 : ペヘン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 6

各阻害剤の IC₅₀ の値

NeuAc-Lactose : 295.5 μM

Disialo-Asn : 428.3 μM

Disialo-Asn-10 : 318.5 μM

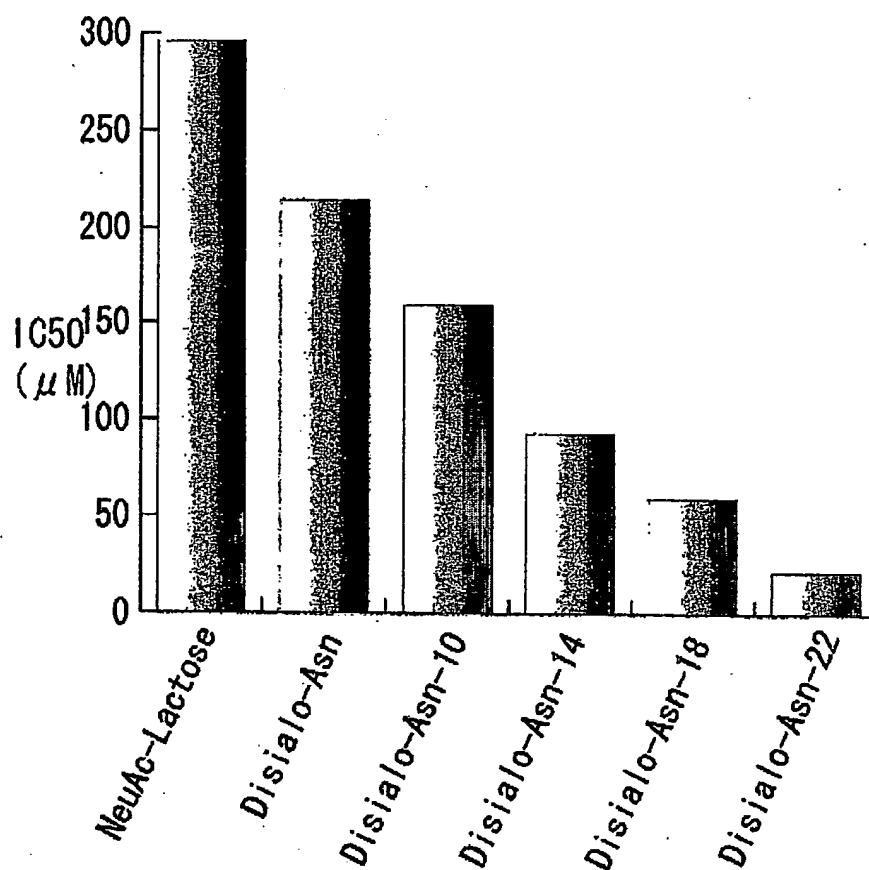
Disialo-Asn-14 : 186.4 μM

Disialo-Asn-18 : 117.9 μM

Disialo-Asn-22 : 42.9 μM

【図5】

Dansyl-LacNAc-NeuAc に対する各阻害剤のシアリダーゼ阻害活性
(阻害剤のモル濃度を基準にした IC50)



各阻害剤の IC50 の値

NeuAc-Lactose : 295.5 μ M Disialo-Asn-14 : 93.2 μ M

Disialo-Asn : 214.2 μ M Disialo-Asn-18 : 58.9 μ M

Disialo-Asn-10 : 79.6 μ M Disialo-Asn-22 : 21.5 μ M

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド、これを含む医薬、特に優れたウイルス感染及び／又は増殖阻害作用を有するインフルエンザウイルス感染症などのウイルス疾患の予防剤及び／又は治療剤を提供する。

【解決手段】 ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド、これを含む医薬並びにジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンを含む医薬。

【選択図】 図 1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-187931
受付番号	50301091363
書類名	特許願
担当官	第六担当上席 0095
作成日	平成15年 7月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 6月30日
-------	-------------

特願2003-187931

出願人履歴情報

識別番号

[502244258]

1. 変更年月日
[変更理由]

2002年 7月 5日

新規登録

住 所
氏 名

神奈川県横浜市都筑区牛久保東2-4-2-205
梶原 康宏

特願2003-187931

ページ: 2

出願人履歴情報

識別番号

[000002288]

1. 変更年月日

1990年 8月 8日

[変更理由]

新規登録

住所

京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1

氏名

三洋化成工業株式会社

特願2003-187931

出願人履歴情報

識別番号

[302060306]

1. 変更年月日

2002年10月15日

[変更理由]

新規登録

住所

大阪府大阪市中央区大手通3丁目2番27号

氏名

大塚化学株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.